

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 13 日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66133 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/22, A61P 9/12, 15/08, 3/04, 3/08, 9/10, 5/02, 37/02, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01149
- (22) 国際出願日: 2001 年 2 月 19 日 (19.02.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-60458 2000 年 3 月 6 日 (06.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川 勉 (NAKA-GAWA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒561-0802 大阪府豊中市曽根東町2-10-4-446 Osaka (JP). 山中 貢 (YAMANAKA, Mitsugu) [JP/JP]; 〒662-0831 兵庫県西宮市丸橋町4-15-624 Hyogo (JP). 泰地睦夫 (TAIJI, Mutsuo) [JP/JP]; 〒569-1044 大阪府高槻市上土室3丁目23-3 Osaka (JP).
- (84) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LEPTIN-RESISTANCE AMELIORATING AGENTS

(54) 発明の名称: レプチン抵抗性改善剤

(57) Abstract: Leptin-resistance ameliorating agents which contain as the active ingredient neurotrophic factors such as BDNF or trk receptor ligands, namely, drugs for ameliorating, treating or preventing hypertension, sterility, obesity, saccharometabolic error, ischemic diseases, growth hormone secretion insufficiency, growth hormone hyposecretion, immune function disorder, etc. caused by leptin resistance.

(57) 要約:

BDNFなどの神経栄養因子、あるいはtrk受容体リガンドを有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤であって、レプチン抵抗性に起因する高血圧、不妊症、肥満、糖代謝異常、虚血性疾患、成長ホルモン分泌不全症、成長ホルモン分泌低下症、免疫機能障害等の改善、治療または予防剤。

WO 01/66133 A1

明 細 書

レプチン抵抗性改善剤

5 技術分野

本発明はレプチン抵抗性改善剤に関する。より詳しくは、神経栄養因子を有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤、すなわち、レプチン抵抗性を改善し、レプチン抵抗性の存在に起因する各種疾病の改善、治療または予防剤に関する。

背景技術

- 10 レプチンは脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、脳の視床下部に働き、摂食抑制作用とエネルギー消費亢進作用を示す因子として発見された。従って、レプチンは抗肥満作用を有すると考えられたが、肥満動物あるいは肥満患者の血中レプチン濃度はむしろ上昇していることが多いことが分かってきた。すなわち、肥満者においては血中レプチン濃度が高いにも関わらず、レプチン作用が
- 15 発揮されない、「レプチン抵抗性」状態が存在すると考えられている。先進国においてはライフスタイルの変化から肥満者が増加しており、肥満が高血圧、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の原因となることから社会問題となっている。

- また、レプチンの生理作用について新しい知見が明らかになってきている。レプチン遺伝子に異常があり肥満を示す ob / ob マウスは生殖機能が欠如していることが知られていたが、外因性にレプチンを投与することで妊娠可能となることが示され、レプチンの作用欠如が不妊の原因となっている可能性が示された
- 20 (Mounzih K. et al., :Endocrinology, 138:1190-1193, 1997)。その他、レプチンは血管新生作用 (Sierra-Honigmann M. R. et al., :Science, 281:1683-1686, 1998)、成長ホルモン分泌促進作用 (Carro E. et al., :Endocrinology 138:2203-2206, 1997)、免疫機能に対する作用 (Ozata M. et al., :J of Clinical Endocrinology & Metabolism 84:3686-3695, 1999) を有することが知られており、レプチンの作用不足は多くの疾患の原因となる可能性がある。
- 25

一方、レプチン抵抗性が存在するために高レプチン血症を呈し、そのためにレプチン作用が過剰となることが2次的に病態の引き金になる場合もあることが報

告されている。すなわち、肥満の程度が同等な高血圧患者と正常血圧のヒトの血中レプチン濃度を比較した場合、高血圧患者の方が血中レプチン濃度が高いこと (Agata J. et al. : Am. J. Hypertension, 10:1171-1174, 1997)、およびレプチンを過剰発現するトランスジェニックマウスにおいては、肥満を伴わないにも関わらず高血圧を示すことから (Ogawa Y. et al. : J. of Hypertension, 16 (suppl. 2) : S7, 1998) 高レプチン血症は肥満と独立した高血圧の原因である可能性が示されている。

レプチン抵抗性が成立するメカニズムは不明であり、レプチン抵抗性に効果を示す薬剤は知られていない。レプチン抵抗性を示す患者の場合、血中レプチン濃度がすでに高値であることから、外因性にレプチンを投与しても効果が弱いことが予想されている。

一方、神経栄養因子は、生体内で標的細胞あるいは神経およびグリア細胞・シュワン細胞から供給され、神経細胞の生存維持、分化促進などの作用を示す蛋白質の総称であり、作用する神経の種類や受容体によって、多くの種類に分類されている。中でも、ニューロトロフィンとして知られる蛋白群は互いに相同性が高く、ファミリーを形成している。神経栄養因子には、神経成長因子 (以下、NGF と略す)、脳由来神経栄養因子 (以下、BDNF と略す)、ニューロトロフィン3 (以下、NT-3 と略す)、ニューロトロフィン4 (以下、NT-4 と略す)、ニューロトロフィン5 (以下、NT-5 と略す) またはニューロトロフィン6 (以下、NT-6 と略す) 等のニューロトロフィン、毛様体神経栄養因子 (以下、CNTF と略す)、グリア細胞由来神経栄養因子 (以下、GDNF と略す) 等がある。また、ニューロトロフィンは、p75 および trk 遺伝子産物である受容体 (trkA、trkB および/または trkC) の特異的リガンドとして作用することが知られている (野々村健、畠中寛 : 実験医学、第13巻、376頁 (1995年))。

発明の開示

本発明の目的は、レプチン抵抗性を軽減し、レプチン抵抗性に起因する肥満や高血圧、不妊症等を改善、治療または予防する新規なレプチン抵抗性改善剤を提供することにある。

本発明者らは、BDNFの薬理作用を検討していたところ、レプチン抵抗性を示すことが知られている高脂肪食負荷マウス(Surwit. R.S. et al., :Diabetes, 46:1516-1520, 1997)に、BDNFを投与することにより、レプチン抵抗性が改善されることを見だし、更なる検討の結果、本発明を完成した。

5 図面の簡単な説明

第1図は高脂肪食負荷マウスの摂餌量に対するBDNFの作用を示すグラフである。

第2図は高脂肪食負荷マウスの体重に対するBDNFの作用を示すグラフである。

10 第3図は高脂肪食負荷マウスの血中レプチン濃度に対するBDNFの作用を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

すなわち、本発明は：

- (1) 神経栄養因子を有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤；
- 15 (2) 神経栄養因子が脳由来神経栄養因子(BDNF)である(1)のレプチン抵抗性改善剤；
- (3) 神経栄養因子が、神経成長因子(NGF)である(1)のレプチン抵抗性改善剤；
- (4) 神経栄養因子が、ニューロトロフィン3(NT-3)である(1)のレプ
20 チン抵抗性改善剤；
- (5) 神経栄養因子が、ニューロトロフィン4(NT-4)である(1)のレプ
チン抵抗性改善剤；
- (6) 神経栄養因子が、ニューロトロフィン5(NT-5)である(1)のレプ
チン抵抗性改善剤；
- 25 (7) 神経栄養因子が、ニューロトロフィン6(NT-6)である(1)のレプ
チン抵抗性改善剤；
- (8) 神経栄養因子が、毛様体神経栄養因子(CNTF)である(1)のレプ
チン抵抗性改善剤；
- (9) 神経栄養因子が、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)である(1)

のレプチン抵抗性改善剤；

(10) t r k A, t r k Bまたはt r k C受容体のリガンドを有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤；

5

(11) t r k B受容体のリガンドを有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤；

(12) レプチン抵抗性由来の高血圧を改善、治療または予防する(1)乃至

(11)記載の薬剤；

(13) レプチン抵抗性由来の不妊症を改善、治療または予防する(1)乃至

(11)記載の薬剤；

10

(14) レプチン抵抗性由来の肥満を改善、治療または予防する(1)乃至(11)記載の薬剤；

(15) レプチン抵抗性由来の糖代謝異常を改善、治療または予防する(1)乃至(11)記載の薬剤；

15

(16) レプチン抵抗性由来の虚血性疾患を改善、治療または予防する(1)乃至(11)記載の薬剤；

(17) 虚血性疾患が脳虚血、虚血性心疾患または下肢虚血である(16)記載の薬剤；

(18) レプチン抵抗性由来の成長ホルモン分泌不全症または成長ホルモン分泌低下症を改善、治療または予防する(1)乃至(11)記載の薬剤；

20

(19) レプチン抵抗性由来の免疫機能障害を改善、治療または予防する(1)乃至(11)記載の薬剤；等

に関する。

以下、詳細に本発明を説明する。

25

「神経栄養因子」とは、生体では、神経成長の標的となる細胞から分泌され、または自己分泌や傍分泌により神経(ニューロン)の成長、分化、生存を助けて、神経回路(シナプス)を形成させる生理活性物質を意味する。神経栄養因子には例えば、神経成長因子(以下、NGFと略す)、脳由来神経栄養因子(以下、BDNFと略す)、ニューロトロフィン3(以下、NT-3と略す)、ニューロトロフィン4(以下、NT-4と略す)、ニューロトロフィン5(以下、NT-5

と略す)、ニューロトロフィン6 (以下、NT-6と略す) 等のニューロトロフィン、毛様体神経栄養因子 (以下、CNTFと略す)、グリア細胞由来神経栄養因子 (以下、GDNFと略す) 等が含まれる。なお、公知の手法にて、神経栄養因子天然配列の一部を置換、欠失あるいは付加して作成した組換神経栄養因子改

5 変体も、同様の生理活性を有する限り、本明細書における「神経栄養因子」に含まれる。

「trkA、trkBおよび/またはtrkC受容体リガンド」とは、「ニューロトロフィン」の受容体として知られるtrk遺伝子発現産物のうち、trkA、trkBまたはtrkCに結合してこれらの受容体を活性化させ、作用を発

10 現させる物質の総称である。具体的には既知のニューロトロフィンとしてtrkAに結合するNGF、trkB結合するBDNF、NT-4、trkCに結合するNT-3等が挙げられる。この概念には、それぞれの「ニューロトロフィン」の改変体 (アミノ酸置換、欠失、付加改変体、糖鎖改変) のみならず、より低分子のペプチド、有機化合物もtrkA、trkBまたはtrkC受容体に対する

15 結合能および活性化能、例えばチロシン残基のリン酸化などを有する限り、「trkA、trkBおよび/またはtrkC受容体リガンド」の概念に含まれる。

これら神経栄養因子ファミリーのうち、特にtrkBまたはtrkC遺伝子発現産物であるtrkBまたはtrkC受容体を介して、生理活性を発現するとされるBDNF、NT-3、NT-4/5がレプチン抵抗性改善剤として有用性が

20 高い。trkB遺伝子発現産物であるtrkB受容体を介して、生理活性を発現するとされるBDNFがレプチン抵抗性改善剤として、特に好ましい。

BDNFは、Bardé, Y. E (The EMBO J., vol. 5, p. 549-553 (1982)) らによって、ブタ脳から単離され、その後クローニングで、119個のアミノ酸から成る一次構造が解析された神経栄養因子である (Leiblock, J et al.: Nature,

25 vol. 341 p. 149 (1989))。N末端にメチオニン残基を有するMet-BDNF、現在公知の手法にて上記の天然配列の一部を置換、欠失あるいは付加して作成した組換BDNF改変体も、BDNF活性を有する医薬製剤である限り、本発明の技術範囲内である。なお、BDNF活性とは、本明細書においては、後根神経節、迷走神経下神経節、運動ニューロン、網膜神経節、黒質ドーパミン作動性ニュー

ロン、前脳基底野コリン作動性ニューロン等の生存維持・分化促進作用などを意味する。この作用は、*in vitro*または*in vivo*で確認する事ができる（特開平5-328974、米国特許第5,180,820）。

5 本明細書において、「レプチン抵抗性」とは、レプチンに対して抵抗性が生じることまたはレプチンに対する感受性が下がることによるレプチン作用不足の状態または症状を意味する。レプチン受容体およびレプチン受容体より下流のレプチンのシグナル伝達経路におけるレプチンの作用低下、作用不全が含まれる。また、レプチン抵抗性により、高レプチン血症が生じ、2次的に惹起されるレプチン作用過剰も含まれる。また、レプチン抵抗性により、具体的には、肥満、不妊症、高血圧症、糖代謝異常、脳虚血、虚血性心疾患、下肢虚血等の虚血性疾患、
10 成長ホルモン分泌不全症または成長ホルモン分泌低下症、免疫機能障害などの病態が生じる。

本明細書において、「レプチン抵抗性改善剤」とは、レプチン抵抗性によるレプチン作用不足を改善する作用を有する薬剤を意味する。レプチン受容体および
15 レプチン受容体より下流のレプチンのシグナル伝達経路におけるレプチン作用低下、作用不全に対する改善作用を有する薬剤も含まれる。また、レプチン抵抗性が存在することにより生じる高レプチン血症のために2次的に惹起されるレプチン作用過剰を改善し、具体的には、肥満、不妊症、高血圧症、糖代謝異常、脳虚血、虚血性心疾患、下肢虚血等の虚血性疾患、成長ホルモン分泌不全症または成長ホルモン分泌低下症、免疫機能障害などの病態を改善、治療または予防する作用を有する薬剤を意味する。
20

レプチン抵抗性が存在することにより生じる高レプチン血症の場合、本発明の「レプチン抵抗性改善剤」は、具体的には血中のレプチン濃度が15 ng/ml以上の患者に投与する。好ましくは、血中のレプチン濃度が20 ng/ml以上の患者に、さらに好ましくは血中のレプチン濃度が25 ng/ml以上の患者に、
25 さらに好ましくは血中のレプチン濃度が30 ng/ml以上の患者に投与する。正常人の血中のレプチン濃度は10 ng/ml以下である。

（製造方法とアッセイ方法）

本発明のレプチン抵抗性改善剤である神経栄養因子（NGF、BDNF、NT

－ 3、NT－ 4 など) は、それぞれの固有の生理活性を示すものであれば、天然抽出品、遺伝子組換え品を問わず、精製して本発明に使用することができる。

(製造)

本発明のレプチン抵抗性改善剤に用いるBDNFは、固有の生理活性を示すものであれば、天然抽出品、遺伝子組換え品を問わず、精製して本発明に使用することができる。BDNFの生産方法としては、(1) BDNF産生組織からの抽出、(2) BDNF産生細胞(初代培養細胞や株化細胞)の培養および抽出、(3) 組換えDNAを導入した宿主細胞の培養および抽出などが考えられるが、一般的には、(3) 組換えDNAを導入した宿主からの抽出が大量生産に適している。

これらのBDNFの生産方法としては種々報告されており、何れの製法によるBDNFも本発明の製剤に用いることができるが、動物組織からの抽出品の場合、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば良い(The EMBO J., vol. 5, p. 549 (1982))。また、BDNFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物(培養上清、培養細胞)から分離精製してBDNFを得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法によりBDNFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適切な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えBDNFを得ることができ(例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 961 (1991), Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 186, p. 1553 (1992))、均質かつ大量のBDNFの生産に好適である。上記宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、植物または動物細胞を用いることができる。

NT－ 3の製造方法：

NT－ 3はBDNFと同様に、種々の宿主細胞で発現させ、生産することができる。Neuron Vol. 4, 767-773 (1990)、あるいは特開平5－ 161493 (WO 91/3659) にその製法、アツセイ法が開示されている。

NT－ 4の製造方法：

NT－ 4はBDNFと同様に、種々の宿主細胞で発現させ、生産することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, 3060-3064 (1992)、特表平7－ 5

09600 (WO93/25684)、あるいは特表平6-501617 (WO92/5254) に組換えNT-4発現方法およびアツセイ方法が記載されている。

CNTFの製造方法：

- 5 CNTFはBDNFと同様に、種々の宿主細胞で発現させ、大量生産することができる。Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1090, 70-80 (1991), J. Neurochemistry, Vol. 57, 1003-1012 (1991)に、組換えCNTF発現方法およびアツセイ方法が記載されている。また、特表平4-502916 (WO90/7341) には、組換え製法と精製方法が開示されている。

- 10 本発明の神経栄養因子を有効成分とするレプチン抵抗性改善剤は、非経口的または経口的に投与できる。

- 15 本発明のレプチン抵抗性改善剤の正確な投与量および投与計画は、個々の治療対象毎の治療方法、疾病または必要性の程度、および、当然医師の判断によることが必要である。非経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば注射剤として皮下または静脈に投与する場合、成人の患者の体重1kg、一日あたり約1～約2500 μ gの範囲、好ましくは約10～約500 μ gの範囲、更に好ましくは約20～約200 μ gの範囲から投与量が選択され、例えば噴霧剤として気管に投与する場合、成人の患者の体重1kg、一日あたり約1 μ g～約2500 μ gの範囲、好ましくは約10～約500 μ gの範囲、更に好ましくは約20～約200 μ gの範囲から選択される。投与計画としては、連日投与または間欠投与またはその組み合わせがある。経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば、成人の患者の体重1kg、一日あたり約5～約2500 μ gの範囲、好ましくは約10～約1000 μ gの範囲から投与量が選択される。

- 25 神経栄養因子を薬学的に許容しうる非毒性の担体と混和することから成る医薬組成物を製造することができる。このような組成物を、非経口投与用（皮下注射、筋肉注射、または静脈注射）に調製する場合は、特に溶液剤型または懸濁剤型がよく、膣または直腸投与用の場合は、特にクリームまたは坐薬のような半固形剤型がよく、経鼻腔投与用の場合特に粉末、鼻用滴剤、またはエアロゾル剤型が

よい。

組成物は一回量投与剤型で投与することができ、また例えばレミントンの製薬科学（マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、PA、1970年）に記載されているような製薬技術上よく知られているいずれかの方法によって調製できる。注射用製剤は医薬担体として、例えば、アルブミン等の血漿由来蛋白、グリシン等のアミノ酸、マンニトール等の糖を加えることができる。注射剤型で用いる場合には更に緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。また、水溶製剤、凍結乾燥製剤として使用する場合、凝集を防ぐためにTween 80（登録商標）、Tween 20（登録商標）などの界面活性剤を添加するのが好ましい。また注射用以外の非経口投与剤型は、蒸留水または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化したナフタレン等を含有しても良い。例えば坐薬のような腔または直腸投与用の製剤は、一般的な賦形剤として例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ油脂等を含有する。腔用製剤では胆汁塩、エチレンジアミン塩、クエン酸塩等の吸収促進剤を含有しても良い。吸入用製剤は固体でもよく、賦形剤として例えばラクトースを含有してもよく、また経鼻腔滴剤は水または油溶液であつてもよい。

一日一回の投与により、長期間、例えば一週間ないし一年間、この発明の化合物を対象に与え続ける剤型が特に望ましい。種々の徐放剤型、デポ剤型または埋め込み投与剤型が利用できる。例えば、投与剤型は神経栄養因子そのまままたは体液に溶解性の低い薬学的に許容しうる神経栄養因子の塩を含有しても良い。このような塩の例としては、（1）リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモ酸、アルギン酸、ポリグルタミル酸、ナフタレンモノまたはジスルホン酸、ポリガラクトロン酸等のような酸付加塩、（2）亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、ニッケルのような多価金属カチオンとの塩または錯体または（1）と（2）との組み合わせ、例えばタンニン酸亜鉛塩等である。神経栄養因子を、好ましくは水難溶性塩に変換し、それをゲル、例えばアルミニウムモノステアレートゲルとごま油等と調合して好適な注射剤としてもよい。この場合特に好ましい塩は亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモ酸塩等である。注射用徐放性製剤のもう一

つの剤型は、神経栄養因子を、好ましくは水難溶性塩に変換し、それをポリ乳酸／ポリグリコール酸の重合体またはその共重合体のような崩壊性の遅い非毒性、非抗原性のポリマーに封入して含有させたものがある。この場合特に好ましい塩は亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモ酸塩等である。その他、神経栄養因子またはその水難溶性塩をコレステロールマトリクスまたはコラーゲンマトリクス中に封入して持続性製剤化することが可能である。

経口剤としては神経栄養因子またはその塩を、レシチン、コレステロール、遊離脂肪酸と共にマイクロカプセル化したもの、それをゼラチンカプセルに封入した製剤等、神経栄養因子またはその塩を腸溶性カプセルに封入した製剤等が挙げられる。該製剤は例えば吸収促進剤、安定化剤、界面活性化剤等を含んでも良い。(毒性)

ニューロトロフィン、特にBDNFの場合、ラットおよびカニクイザルで、それぞれを100mg/kg、60mg/kgの皮下投与を4週間実施したが、死亡例はなく、また、急性毒性の点についても、ラットおよびカニクイザルで200mg/kgの投与量でも死亡の発現は無く安全性は高い。

実施例

以下、本発明を実施例にて説明する。

実施例1：高脂肪食負荷マウスに対するBDNFの作用

(1) 実験材料

試薬：BDNFはリジェネロン社より購入したものを使用し、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

実験動物：雄性C57BL/6Nマウス(SPF規格)を日本チャールズリバー社より購入、予備飼育の後、8週齢で実験に使用した。

飼育環境：温度20℃以上26℃以下、相対湿度30%以上70%以下に制御され、照明は8:00～20:00点灯、20:00～8:00消灯のサイクルに設定された部屋で飼育した。予備飼育中は固形飼料(CE-2、日本クレア)および滅菌水道水を自由摂取させた。

(2) 高脂肪食負荷マウスの作成

C57BL/6Nマウスを2群に分け、1群には通常の固形飼料、残りのマウ

スには高脂肪含有餌（CE-2+30%ラード）を与え、2ヵ月間飼育を行った。

(3) 投与液の調製

BDNF投与液として、20mg/mlのBDNFを含む溶液（10mMリン酸、150mM塩化ナトリウム、0.01%Tween 80、1%マンニトール）を調製した。また、BDNFを含まない10mMリン酸、150mM塩化ナトリウム、0.01%Tween 80、1%マンニトールを溶媒対照液とした。

(4) 被験物質の投与

BDNFは20mg/kg（1ml/kg）の割合で皮下投与し、対照群には溶媒を1ml/kgの割合で皮下投与した。投与は1日1回とし、6日間投与を行った。

(5) 高脂肪食負荷マウスの摂餌量、体重に対するBDNFの作用

上記2ヵ月間高脂肪含有餌を負荷したマウスにBDNFあるいは溶媒を6日間投与したのち、給餌箱重量を測定し、給餌量から残餌量を差し引くことにより摂餌量を求めた。そのマウスの給餌量に対するBDNFの作用を示すグラフを第1図に示す。

第1図において、白色のカラムは通常の固形飼料（通常餌）を摂取させ溶媒を投与したマウス、黒色のカラムは高脂肪食を摂取させ溶媒を投与したマウス、黒色斜線のカラムは高脂肪食を摂取させBDNFを投与したマウスの投与期間中の平均摂餌量を示す。データは各群（7匹）の平均値±SDで示した。**はStudentのt検定において $p < 0.01$ で通常餌摂取、溶媒投与群に対して有意であることを示している。##はTukeyの検定において $p < 0.01$ で高脂肪食負荷、溶媒投与群に対して有意であることを示している。

上記BDNFあるいは溶媒を6日間投与した高脂肪食負荷マウスの体重を動物天秤を用いて測定した。その高脂肪食負荷マウスの体重に対するBDNFの作用を示すグラフを第2図に示す。

第2図において、白色のカラムは通常の固形飼料（通常餌）を摂取させ溶媒を投与したマウス、黒色のカラムは高脂肪食を摂取させ溶媒を投与したマウス、黒色斜線のカラムは高脂肪食を摂取させBDNFを投与したマウスの投与6日目の体重を示す。データは各群（7匹）の平均値±SDで示した。**はStudent

ent の t 検定において $p < 0.01$ で通常餌摂取、溶媒投与群に対して有意であることを示している。# は Tukey の検定において $p < 0.05$ で高脂肪食負荷、溶媒投与群に対して有意であることを示している。

第 1 図に示すグラフからも明らかなように、BDNF は高脂肪食負荷マウスの摂餌量を減少させることが分かった。また、第 2 図に示すように、高脂肪食負荷マウスは通常餌を摂取しているマウスよりも肥満しているが、BDNF の投与により肥満が改善されていることが分かった。

(6) 高脂肪食負荷マウスの耐糖能に対する BDNF の作用

上記 2 ヶ月間高脂肪含有餌を負荷したマウスに BDNF あるいは溶媒を 6 日間投与した後、マウスを一晩絶食させ、 3 g/kg (体重) のグルコースを経口投与し、90 分間糖負荷したのち、以下のようにして血糖値を測定し、耐糖能に対する BDNF の作用を調べた。

すなわち、尾静脈より $10 \mu\text{l}$ の血液を採取し、 0.4 N 過塩素酸水溶液 $100 \mu\text{l}$ と混和した。 0.37 M 炭酸カリウム水溶液 $50 \mu\text{l}$ を添加して中和し、遠心後の上清についてグルコース CII・テストワコー (グルコース定量キット、ムタローゼ・GOD 法、和光純薬) を用いてグルコース濃度を測定した。その結果を表 1 に示す。

表 1 経口糖負荷試験による評価

通常食	高脂肪食負荷	
溶媒	溶媒	BDNF
159.6 ± 15.4	$189.4 \pm 24.6^{**}$	$154.9 \pm 10.7^{##}$

表 1 中のデータは糖負荷 90 分後の血糖値 (mg/dl) を示し、各群 (7 匹) の平均値 $\pm \text{SD}$ で示した。 ** は Student の t 検定において $p < 0.01$ で通常餌摂取、溶媒投与群に対して有意であることを示している。 $^{##}$ は Tukey の検定において $p < 0.01$ で高脂肪食負荷、溶媒投与群に対して有意であることを示している。

上記表 1 に示す結果からも明らかなように、高脂肪食負荷マウスでは糖負荷 90 分後の血糖値が通常餌を摂取させたマウスよりも有意に高く、耐糖能異常を呈していることが分かった。BDNF の投与によって血糖値は有意に低下し、BD

NFは高脂肪食負荷マウスの耐糖能異常を改善する作用を有することが分かった。

(7) BDNFの血中レプチン濃度に対する作用

上記2ヵ月間高脂肪含有餌を負荷したマウスにBDNFまたは溶媒を6日間投与したのち、その6日目にマウス尾静脈より血液を採取し血清を分離した後に、
5 市販マウスレプチンELISAキット (ANALYZA mouse Leptin、ジェンザイム
テクネ社) を使用して血清中レプチン濃度を測定した。

その結果を第3図に示す。図中、白色のカラムは通常の固形飼料（通常餌）を
摂取させ溶媒を投与したマウス、黒色のカラムは高脂肪食を摂取させ溶媒を投与
したマウス、黒色斜線のカラムは高脂肪食を摂取させBDNFを投与したマウス
10 の投与6日目の体重を示す。データは各群（7匹）の平均値±SDで示した。

**はStudentのt検定において $p < 0.01$ で通常餌摂取、溶媒投与群
に対して有意であることを示している。##はTurkeyの検定において $p < 0.01$
で高脂肪食負荷、溶媒投与群に対して有意であることを示している。

第3図に示されるように、高脂肪食負荷マウスでは通常餌を摂取させたマウス
15 よりも血清中レプチン濃度が有意に高く、レプチン抵抗性を呈していることおよ
びBDNFの投与により血清中レプチン濃度は有意に低下し、BDNFはレプチ
ン抵抗性の改善作用を有することが分かった。

産業上の利用の可能性

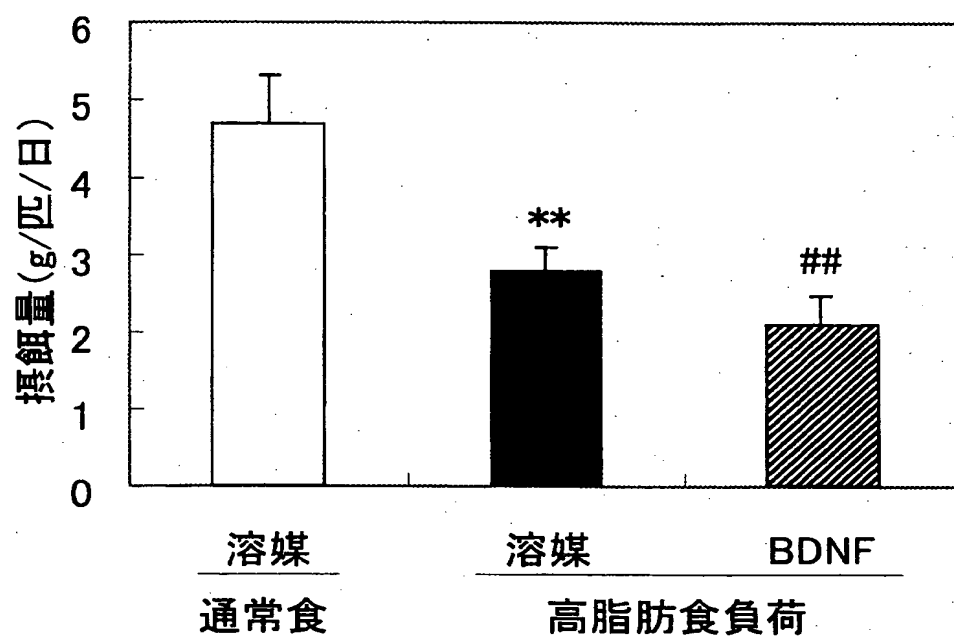
本発明のレプチン抵抗性改善剤は、レプチン抵抗性によるレプチン作用不足を
20 改善し、肥満や不妊症を改善、治療または予防する作用を有する。また、レプ
チン抵抗性が存在することにより生じる高レプチン血症のために2次的に惹起され
るレプチン作用過剰を改善し、高血圧症などの病態を改善、治療または予防する
作用を有する。

請 求 の 範 囲

1. 神経栄養因子を有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤。
2. 神経栄養因子が脳由来神経栄養因子である請求項1のレプチン抵抗性改善剤。
- 5 3. レプチン抵抗性由来の高血圧を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
4. レプチン抵抗性由来の不妊症を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
5. レプチン抵抗性由来の肥満を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
- 10 6. レプチン抵抗性由来の糖代謝異常を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
7. レプチン抵抗性由来の虚血性疾患を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
- 15 8. レプチン抵抗性由来の成長ホルモン分泌不全症または成長ホルモン分泌低下症を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
9. レプチン抵抗性由来の免疫機能障害を改善、治療または予防する請求項1または2記載の薬剤。
10. $trkA$ 、 $trkB$ または $trkC$ 受容体のリガンドを有効成分として含有するレプチン抵抗性改善剤。
- 20

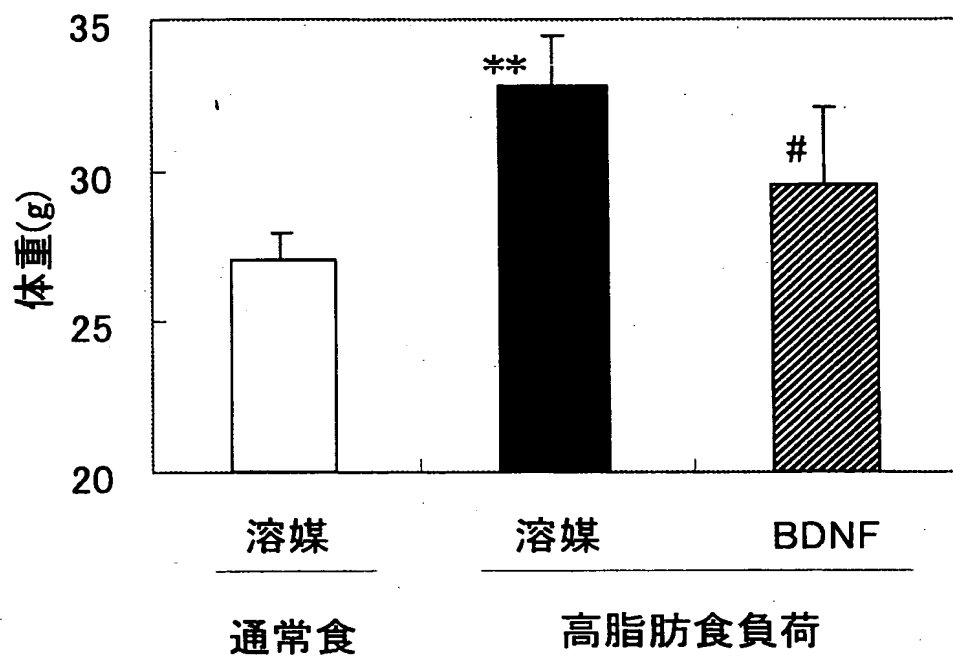
1/3

第1図



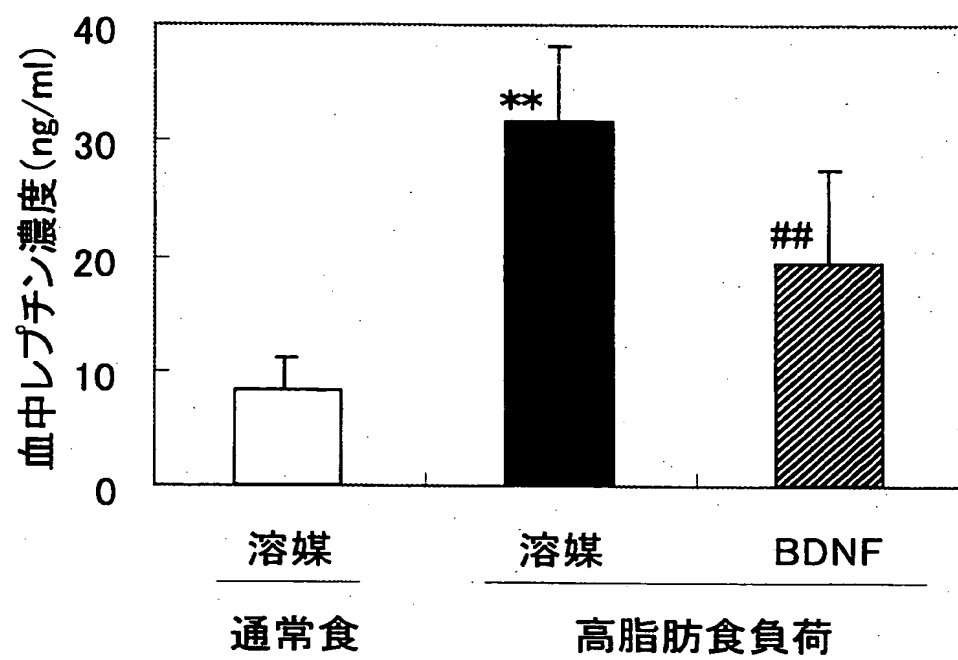
2/3

第2図



3/3

第3図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/22, A61P9/12, A61P15/08, A61P3/04,
A61P3/08, A61P9/10, A61P5/02, A61P37/02,
A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), WPI/L (QUESTEL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 10-279500, A (Sumitomo Pharmaceuticals Company Limited); 20 October, 1998 (20.10.98), Claim 9 (Family: none)	1, 2, 5, 10 3, 4, 6-9
X Y	WO, 98/22128, A1 (ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.P.A.), 28 May, 1998 (28.05.98), the whole description, esp., page 2, lines 9-24 & AU, 9851344, A1 & AU, 727174, B2 & EP, 946189, A1 & JP, 2000-511561, A	1, 5, 6 2-4, 7-10
Y	WO, 98/32458, A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Company Limited), 30 July, 1998 (30.07.98), Claims & AU, 9854970, A & AU, 718500, B & EP, 1010432, A1 & CN, 1250379, A & NZ, 336865, A	2, 10
Y	Datebase Medline on STN, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA), No. 9370390, Agata, J., et al "High	3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 May, 2001 (02.05.01)

Date of mailing of the international search report
15 May, 2001 (15.05.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01149

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension," abstract, Am. J. Hypertens., October 1997	
Y	MOUNZIH, K., LU, R. and CHEHAB, F.F. " Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males," Endocrinology, March 1997, Vol.138, No.3, pages 1190-3	4
Y	SIERRA-HONIGMANN, M. R., et al "Biological action of leptin as an angiogenic factor," Science, September 1998, Vol.281, No.5383, pages 1683-6	7
Y	CARRO, E., et al "Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin," Endocrinology, May 1997, Vol.138, No.5, pages 2203-6	8
Y	OZATA, M., OZDEMIR, I. C. and LICINIO, J. "Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects," J. Clin. Endocrinol. Metab., October 1999, Vol.84, No.10, pages 3686-95	9
A	WO, 00/09147, A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Company Limited), 24 February, 2000 (24.02.00), Claims & AU, 9951956, A	1-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/01149

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, A61P9/12, A61P15/08, A61P3/04,
A61P3/08, A61P9/10, A61P5/02, A61P37/02,
A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-38/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), WPI/L (QUESTEL)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 10-279500, A (住友製薬株式会社) 20. 10月. 1998 (20. 10. 98), 請求項9参照 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 10 3, 4, 6-9
X Y	WO, 98/22128, A1 (ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S. P. A.) 28. 5月. 1998 (28. 05. 98), 明細書全体、特に第2頁第9行~第24行参照 & AU, 9851344, A1 & AU, 727174, B2 & EP, 946189, A1 & JP, 2000-511561, A	1, 5, 6 2-4, 7-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 05. 01

国際調査報告の発送日

15.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高原 慎太郎

印

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/32458, A1 (住友製薬株式会社) 30. 7月. 1998 (30. 07. 98), 請求の範囲参照 & AU, 9854970, A & AU, 718500, B & EP, 1010432, A1 & CN, 1250379, A & NZ, 336865, A	2, 10
Y	Datebase Medline on STN, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA), No. 9370390, Agata, J., et al "High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension," abstract, Am. J. Hypertens., October 1997	3
Y	MOUNZIH, K., LU, R. and CHEHAB, F. F. "Leptin treatment rescues thesterility of genetically obese ob/ob males," Endocrinology, March 1997, Vol. 138, No. 3, pages 1190-3	4
Y	SIERRA-HONIGMANN, M. R., et al "Biological action of leptin as an angiogenic factor," Science, September 1998, Vol. 281, No. 5383, pages 1683-6	7
Y	CARRO, E., et al "Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin," Endocrinology, May 1997, Vol. 138, No. 5, pages 2203-6	8
Y	OZATA, M., OZDEMIR, I. C. and LICINIO, J. "Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects," J. Clin. Endocrinol. Metab., October 1999, Vol. 84, No. 10, pages 3686-95	9
A	WO, 00/09147, A1 (住友製薬株式会社) 24. 2月. 2000 (24. 02. 00), 請求の範囲参照 & AU, 9951956, A	1-10